

ヒトマスト細胞活性化阻害によるアレルギー疾患の 新規治療薬の開発

岡山吉道¹⁾, 照井 正¹⁾, 権 寧博¹⁾, 浅野正岳²⁾, 秋久俊博³⁾

Development of new therapy of allergic diseases by inhibition of human mast cell activation

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾, Tadashi TERUI¹⁾, Yoshihiro GON¹⁾,
Masatake ASANO²⁾, Toshihiro AKIHISA³⁾

要旨

FcεRI β鎖の発現が抑制されたマスト細胞ではFcεRIの架橋による脱顆粒, prostaglandin (PG) D₂産生, サイトカイン産生は統計学的有意に抑制された。β鎖の発現が抑制されたマスト細胞ではLynの細胞膜への移行が阻止されていることがわかった。Lynの細胞膜への移行を阻止するため, FcεRI β鎖のimmunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) のチロシン残基をリン酸化させたペプチドをマスト細胞へ導入するとIgE依存性の活性化が抑制された。FcεRI β鎖のITAM のチロシン残基をリン酸化させたペプチドは細胞内Lynに会合し, Lynが細胞膜へ移行するのを抑制していた。したがって, FcεRI β鎖とLynの会合を阻止することによってヒトマスト細胞のIgE依存性の活性化を抑制できることがわかり, β鎖ITAMのチロシン残基を3つリン酸化したペプチドがアレルギー疾患の治療に有用であることが示唆された。

1. はじめに

マスト細胞は即時型のアレルギー反応を惹起するのみならず, マスト細胞の産生, 放出するケモカインやサイトカイン, ロイコトリエンなどのメディエーターにより, 遅発型のアレルギー反応および慢性炎症を惹起する, 炎症のコンダクターであり, マスト細胞の制御が治療の一つの鍵になる。現在のマスト細胞活性化阻害薬はげっ歯類のマスト細胞の活性化は抑制するが, ヒトマスト細胞の活性化に対する抑制効果はない。唯一, ヒト化された抗ヒトIgE抗体はIgEと高親和性IgE受容体FcεRIの結合を阻害し, ヒトマスト細胞の活性化を阻害するが, 極めて高価である。

我々の研究室ではマウスFcεRI β鎖の機能に関して詳細な検討を行っている。β鎖immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) には定型的なITAM (YXXLX₇₋₁₁YXXL) と異なり3つ目の非定型的なチロシン残基 (YEELNVYSPYSEL) が存在す

る。細胞膜上に発現しているFcεRIが架橋される条件下では, β鎖ITAMのすべてのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した (FFF) マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) ではFcεRIの架橋による活性化Lynとβ鎖との会合, Syk, LAT, SHIP-1などのリン酸化が減少し, 脱顆粒および脂質メディエーターの産生能が野生型 (YYY) BMMCと比較して低下するが, 一方NF-κBの転写活性化能およびIL-6, IL-13, TNF-αの産生は顕著に亢進している¹⁾。ヒトのβ鎖の役割に関しては, NIH3T3細胞にヒトFcεRI α鎖とγ鎖を共発現した細胞とヒトFcεRI α鎖とγ鎖とβ鎖を共発現した細胞にさらにSykとLynを共発現させ, FcεRIの架橋によりFcεRI α鎖とγ鎖とβ鎖を共発現した細胞の方が, α鎖とγ鎖のみを共発現した細胞に比較してSykとLynのリン酸化の程度が大きいことよりβ鎖はシグナル情報伝達の増幅因子だと報告されている^{2,3)}。また, β鎖の欠損マウスにヒトα鎖を過剰発現させ, さ

1) 日本大学医学部

2) 日本大学歯学部

3) 日本大学理工学部

岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

らにヒト β 鎖を導入したマウスのほうがヒト β 鎖を導入しなかったマウスに比較してI型のアレルギー反応が大きかったことより、 β 鎖はシグナル情報伝達の増幅因子だと結論付けられている⁴⁾。シグナル分子は会合する蛋白により異なる細胞応答が誘導されることもあり、ヒトの β 鎖の役割を検討するには、 β 鎖が実際に発現しているヒトマスト細胞あるいは好塩基球での検討が必要である。また、マウスとヒトでは β 鎖の役割に種差があるかどうか不明のままである。その理由として、市販のヒトFc ϵ RI β 鎖に対する抗体は内在性のヒトのマスト細胞や好塩基球Fc ϵ RI β 鎖を捕らえることができなかったことが挙げられる。我々は感度が高く、特異性の高い抗体作成に成功した⁵⁾。この抗体を用いてアレルギー疾患患者（アトピー性角結膜炎および春季角結膜炎）および健常人の結膜のマスト細胞の $\alpha\beta\gamma_2$ と $\alpha\gamma_2$ の発現比率を免疫組織化学染色によって調べたところ、アレルギー患者でマスト細胞数が増加しているのみならず、 β^+ cells/ α^+ cellsの比率はアレルギー疾患患者(0.69 \pm 0.08)で健常人(0.07 \pm 0.16)に比較して有意に増加していた。また、 β^+ マスト細胞は上皮細胞周囲に局在していた⁶⁾。すなわちアレルギーと接触しやすい場所にFc ϵ RI β 鎖陽性マスト細胞は増加していることがわかった。

今回、我々はFc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドを細胞膜透過性ペプチドと結合させ、ヒトマスト細胞に導入すると、IgE依存性のヒトマスト細胞の活性化をほぼ完全に抑制することを見出した。

2. 対象及び方法

倫理的考慮:生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている。安全対策に関しては、日本大学遺伝子組換え実験実施規定に定める学長の確認を受けて実施した。

細胞: ヒト末梢血および臍帯血培養マスト細胞はすでに報告した方法を用いて樹立した⁷⁾。ヒト末梢血より単核球を分離し、単核球から lineage negative 細胞(CD4⁻, CD8⁻, CD11b⁻, CD14⁻, CD16⁻, およびCD19⁻細胞)を分離したのち、臍帯血ではCD34⁺

細胞を分離したのち、stem cell factor (SCF; 200 ng/ml, PeproTech EC Ltd., London, England), IL-6 (50 ng/ml, PeproTech EC Ltd.) およびIL-3 (1ng/ml, PeproTech EC Ltd.) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と Iscove's modified Dulbecco's medium) で培養した。42日目にPBSでIscove methylcellulose mediumを洗浄し、SCF (100 ng/ml) およびIL-6 (50 ng/ml) を含んだIscove's modified Dulbecco's mediumで培養した。

RT-PCR: マスト細胞の総RNAはRNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて抽出し、精製した。500 μ g/mL oligo (dT₁₂₋₁₈) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 mM dNTP mix (Invitrogen), 5 x first strand buffer (Invitrogen), 0.1 M DTT (Invitrogen), SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) および RNase OUT (Invitrogen) を用いてcDNAに逆転写を行った。定量的RT-PCRは、TaqMan解析を用いた。Fc ϵ RI α の sense primerの配列は下記の通りである。(5'-TGGAATCCCCTACTCTACTGTGTGTA-3') antisense primerの配列は下記の通りである。(5'-CCTTAGGTTTCTGAGGGACTGC-3') また probeの配列は下記の通りである。(5'-FAM-CCTTACTGTTCTTCGCTCCAGATGGCGTGT-TRAM-3') Fc ϵ RI β , Fc ϵ RI γ およびGAPDHの primer と probeは Assays-on-Demand™ service (Applied Biosystems, 東京) のものを使用した。

遺伝子発現抑制: レンチウイルスベクターを用いた shRNA技術⁸⁾にてヒト末梢血由来培養マスト細胞Fc ϵ RI β 鎖およびLynの発現抑制をおこなった。Fc ϵ RI β とLynのコンストラクションに対する sense と antisense オリゴヌクレオタイド配列のレンチウイルス発現プラスミドはSigma-Aldrichから購入した。

フローサイトメトリー: マスト細胞のフローサイトメトリーによる解析はすでに報告した方法を用いて行った⁹⁾。PEあるいはビオチン標識抗Fc ϵ RI α モノクローナル抗体(クローンCRA1), PE標識抗CD63(クローンH5C6, BD Biosciences, San Diego, CA), あるいは膜透過性モチーフ¹⁰⁾を含んだFITC標識

FcεRI β ITAM ペプチド, FcεRI β のNおよびC末端 (表1) を用いた。これらのペプチドは東レリサーチセンター (神奈川) で製作した。PE/Cy5-streptavidin は Biolegend から購入した (San Diego, CA)。

表1. FcεRI β 鎖のITAMのチロシン残基 (Y) をリン酸化させたペプチドおよびコントロールのペプチド

(1) YYY-FITC 標識
(2) YY (p) Y-FITC 標識
(3) Y (p) YY (p) -FITC 標識
(4) Y (p) Y (p) Y (p) -FITC 標識
(5) N 末端-FITC 標識
(6) C 末端 1-FITC 標識
(7) C 末端 2-FITC 標識
Y (p) ; phospho-Y

共焦点顕微鏡による解析: 共焦点顕微鏡による解析はすでに報告した方法を用いて行った⁹⁾。細胞を固定して、膜の穴あけをした後、ウサギ抗FcεRI β 抗体⁵⁾、マウス抗Lynモノクローナル抗体 (クローンLYN-01; Biovendor, Brno, Czech Republic), アイソタイプコントロールマウスIgG1, ウサギIgG, あるいはFITC標識FcεRI β ペプチド (東レリサーチセンター) とインキュベートした。次に細胞をrhodamine標識ヤギ抗マウスIgG (Millipore, Billerica, MA) あるいはAlexa Fluor 488標識ヤギ抗ウサギIgG (Invitrogen, Carlsbad, CA) とインキュベートした。FV500あるいはFV1000型共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, 東京) を用いた

イムノプロット: 細胞のライセイトとウサギ抗FcεRI β 抗体⁵⁾, 抗FcεRI α 抗体, 抗FcεRI γ 抗体, 抗Lyn抗体および抗PLC γ 1抗体 (Upstate Biotechnology) および抗βアクチン抗体 (クローンC4, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) をインキュベートした。

プルダウンアッセイ: pre-cleared細胞のライセイトは、ビオチン標識FcεRI β ペプチド (東レリサーチセンター) とインキュベートした。次に streptavidin immobilized Sepharose ビーズ (GE Healthcare, Up-

psala, Sweden) を細胞ライセイトに加えそのチューブを4℃で2時間インキュベートした。ビーズを洗浄した後、回収されたタンパクをウエスタンブロット法を用いて解析した¹¹⁾。

マスト細胞の活性化: マスト細胞を0.01 ~ 30 μg/mlの抗FcεRI αモノクローナル抗体 (クローンCRA1) あるいはカルシウムイオノフォアA23187 (10⁻⁶M) で30分刺激し, ヒスタミン遊離とPGD₂産生を測定するためその細胞上清あるいは細胞ペレットを回収した。サイトカイン測定では6時間刺激後, 細胞上清を回収した。

脱顆粒, PGD₂産生, サイトカイン産生測定: ヒスタミン遊離とPGD₂産生は酵素免疫法, サイトカイン産生はELISA法を用いた。

統計解析: 2群間の統計学的解析はunpaired Student t-testを用いてP<0.05を有意とした。

3. 結果

FcεRI β 鎖の発現抑制による細胞表面のFcεRIの発現とIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化への影響
FcεRIの架橋後の脱顆粒および脂質メディエーターの産生能, サイトカイン産生能におけるFcεRI β 鎖の役割を検討する目的にてレンチウイルスベクターを用いたshRNA技術にてヒト末梢血由来培養マスト細胞FcεRI β 鎖の発現抑制をおこなった。FcεRI β 鎖の発現が抑制されたマスト細胞では細胞表面のFcεRIの発現が有意に抑制された (図1A, B)。またFcεRIの架橋による脱顆粒, PGD₂産生, サイトカイン産生は統計学的有意に抑制された (図1C, D, E, F)¹²⁾。

FcεRI β 鎖がIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化を制御している機序の検討

FcεRIの架橋後にβ鎖はLynなどのSrc kinaseによってITAMのチロシン残基がリン酸化され, 同時にチロシンリン酸化されたβ鎖ITAMにLynが会合し, Lynが細胞膜へ移行するが, FcεRIβ鎖の発現が抑制されたマスト細胞ではLynの細胞膜への移行が阻止されていることがわかった (図2)。

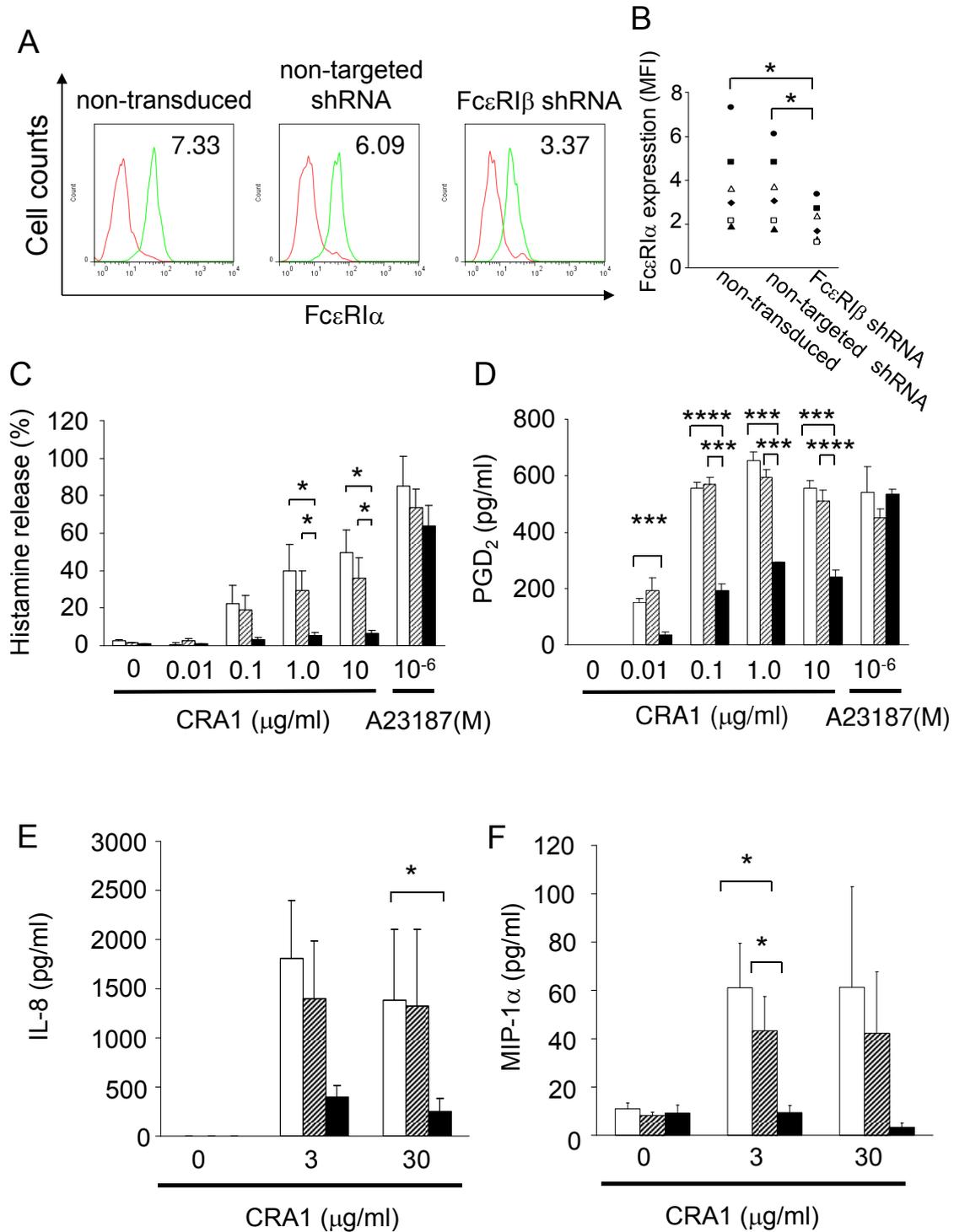


図1. FcεRIβ鎖の発現抑制による細胞表面のFcεRIの発現とIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化への影響
 A) FcεRIβ鎖の発現抑制による細胞表面のFcεRIの発現 (フローサイトメトリー解析) 赤線がアイソタイプコントロール, 緑線がFcεRIの発現
 B) はAの統計学的解析 (n = 6) MFIで解析. C-F) 白バーが非処理マスト細胞, 横線のバーがコントロールshRNAを導入したマスト細胞, 黒バーがFcεRIβ鎖shRNAを導入したマスト細胞 (文献12より引用)

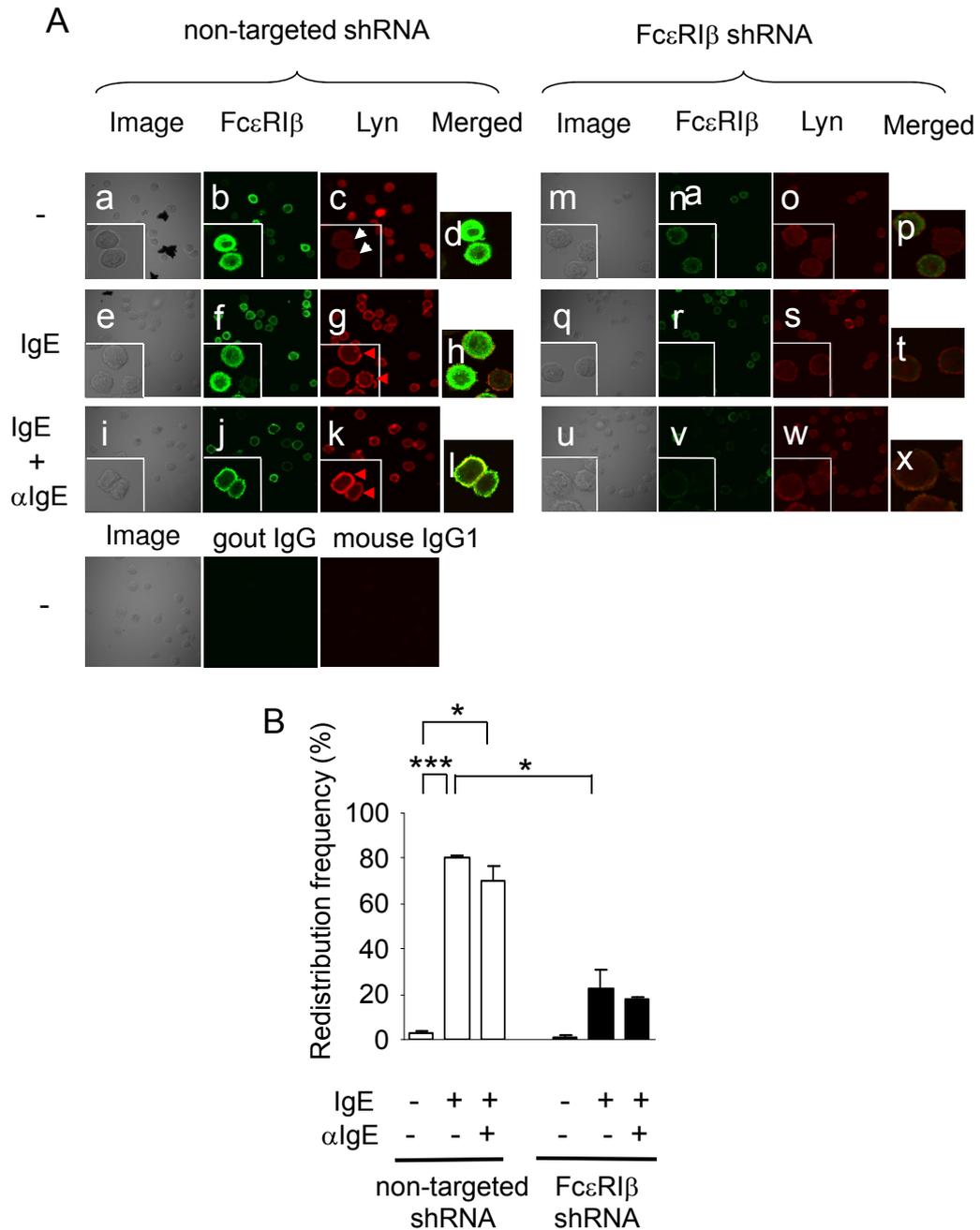


図2. マスト細胞活性化によるLynの細胞膜への移行へのFcεRIβ鎖の発現の抑制の影響

A) コントロールshRNAを導入したマスト細胞とFcεRIβ鎖shRNAを導入したマスト細胞の非刺激(-), IgE感作, IgE + 抗IgE抗体刺激後のFcεRIβ鎖とLynの細胞内局在。白矢印はLynが細胞質内に散在しているが赤矢印は細胞膜内へ局在していることを示す。

B) 赤矢印の細胞のようにLynがring状に細胞膜内へ移行した細胞を陽性細胞としてカウントした。(文献12より引用)

Lynの発現抑制によるIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化への影響

β 鎖の発現抑制されたマスト細胞 (Fc ϵ RI β shRNA) ではLynの細胞膜への移行がコントロール (control shRNAに見られる赤い環状の細胞) に比較して阻止されていた。したがってFc ϵ RI β 鎖がIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化を制御していることがこれらのデータから示唆され、Lynの細胞膜への移行を阻止することがIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化を抑制できるのではないかと考えレンチウイルス

ベクターを用いたshRNA技術にてヒト末梢血由来培養マスト細胞Lynの発現抑制を行いIgE依存性の脱顆粒を検討したところ、Lynの発現抑制によってIgE依存性のヒトマスト細胞の脱顆粒は有意に抑制された(図3)。

Fc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドのヒトマスト細胞の活性化への影響

Fc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基 (Y) をリン酸化させたペプチドおよびコントロールのペプチドを作

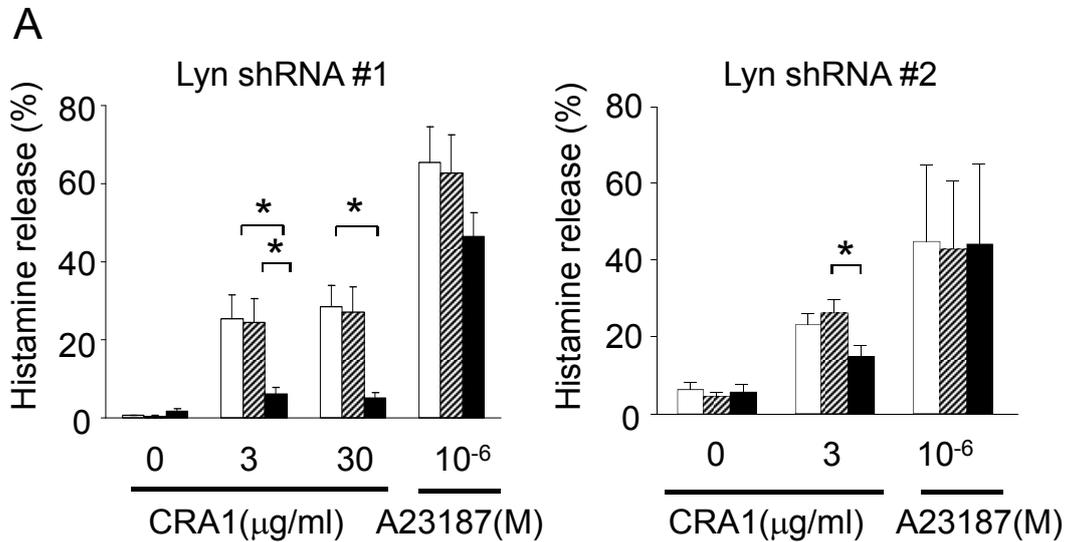


図3. Lynの発現抑制によるIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化への影響
白バーが非処理マスト細胞, 横線のバーがコントロールshRNAを導入したマスト細胞, 黒バーがLyn shRNAを導入したマスト細胞 (文献12より引用) #1と#2の2種類のLyn shRNAを用いた

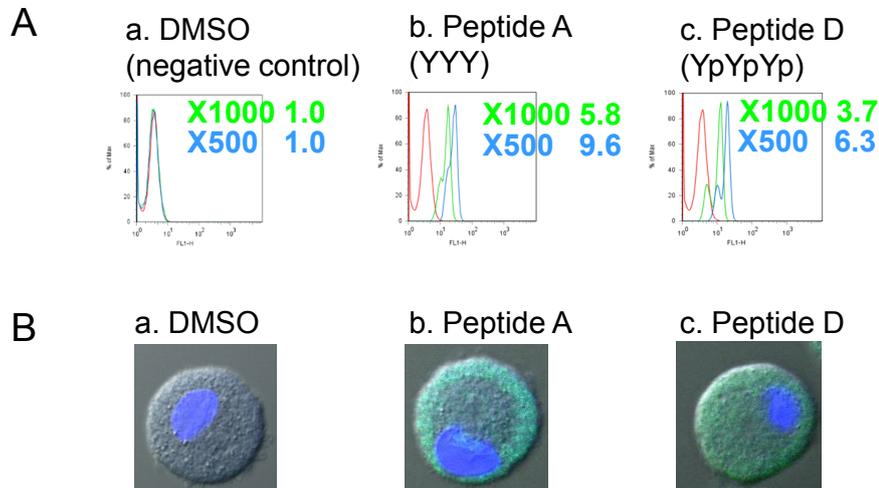


図4. ペプチドのヒトマスト細胞内への移行 (A) FACS解析と (B) 共焦点レーザー顕微鏡解析 (文献12より引用)

製した (表1)。N末端に膜透過性ペプチド (AAV-LLPVLLAAP), C末端にFITCを付けた。

これらペプチドのヒトマスト細胞内への移行を共焦点レーザー顕微鏡とFACSで確認した (図4)。このペプチドは細胞膜付近に存在することが分かった。次にβ鎖ITAMのチロシン残基を3つリン酸化したペプチドはマスト細胞内のLynと会合することをプルダウンアッセイで確認した (図5A)。そこでヒトマスト細胞をヒトリコンビナントIgE (1μg/ml) で24時間感作したのち、洗浄し、それぞれのペプチド2μMと細胞を10分37°Cでインキュベートし、抗IgE抗体あるいはcalcium ionophore A23187で30分37°Cでインキュベートしたのちの細胞上清中に遊離されたヒスタミンを測定したところβ鎖ITAMのチロシン残基を3つリン酸化したペプチド [上記ペプチド (4)] および外側2つのチロシン残基をリン酸化したペプチド [上記ペプチド (3)] がIgE依存性の脱顆粒 (図5B) とPGD₂産生 (data not shown) を統計学的有意に抑制した。我々はこのβ鎖ITAMのチロシン残基を3つリン酸化したペプチドを特許申請した。

FcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドのアレルギー患者の粘膜組織におけるヒトマスト細胞の活性化への影響

手術で得られたアレルギー疾患患者 (アトピー性角結膜炎および春季角結膜炎) の結膜切片を細切し、無血清培地で上記ペプチド (1) YYY-FITC標識, (4) Y (p) Y (p) Y (p) -FITC標識, (5) N terminus-FITC標識を加え30分間培養した。抗IgE抗体を加えインキュベートし、組織上清と組織中のヒスタミンを測定したところY (p) Y (p) Y (p) はIgE依存性の脱顆粒を抑制した (図5C)。

FcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドがヒトマスト細胞の活性化を抑制する機序の検討

細胞内に移行したβ鎖ITAMのチロシン残基を3つリン酸化したペプチドが細胞内のLynと会合するかどうかを調べる目的にて上記ペプチド (1), (4), (5) をヒトマスト細胞内に移行させた後、FcεRIを架橋

させLynの局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。FcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドは細胞内Lynに会合し、Lynが細胞膜へ移行するのを抑制していることが共焦点顕微鏡を用いた検討にて確認した。図6はペプチドが導入された細胞はペプチドをFITC標識しているため緑色に発色している。Lynは赤色に染色されている。コントロールペプチド (N末端) が導入されたマスト細胞ではマスト細胞をIgE + anti-IgEで活性化した後、約60%のマスト細胞のLynは細胞膜付近に移動し、ring様に赤く染色されるがFcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチド (YpYpYp) の入ったマスト細胞ではマスト細胞をIgE + anti-IgEで活性化した後、約20%のマスト細胞においてのみLynの細胞膜付近への移動が観察された。

Lynをもつマスト細胞、好塩基球以外の細胞におけるβ鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドの影響

U937セルライン (単球系のセルライン) をIFN-γでインキュベートし細胞表面の高親和性IgG受容体FcγRIの発現を増加させたのち、FcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドとITAMのコントロールペプチドを加え、ヒツジ抗マウスIgG抗体を用いてFcγRIを架橋させた。24時間後に上清を回収し、IL-8産生に対する影響を比較検討した。2実験で (peptide D) YpYpYp-FITCは、ヒツジ抗マウスIgG抗体によるFcγRIの架橋後の、IL-8産生に対して何ら影響を及ぼさなかった (data not shown)。

4. 考察

FcεRIの架橋後の脱顆粒および脂質メディエーターの産生能、サイトカイン産生能におけるβ鎖の役割を検討する目的にてレンチウイルスベクターを用いたshRNA技術にてヒト末梢血由来培養マスト細胞FcεRI β鎖の発現抑制をおこなった。FcεRI β鎖の発現が抑制されたマスト細胞ではFcεRIの架橋による脱顆粒、PGD₂産生、サイトカイン産生は統計学的有意に抑制された。また、FcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドがアレルギー患者の粘膜組織におけるヒトマスト細胞

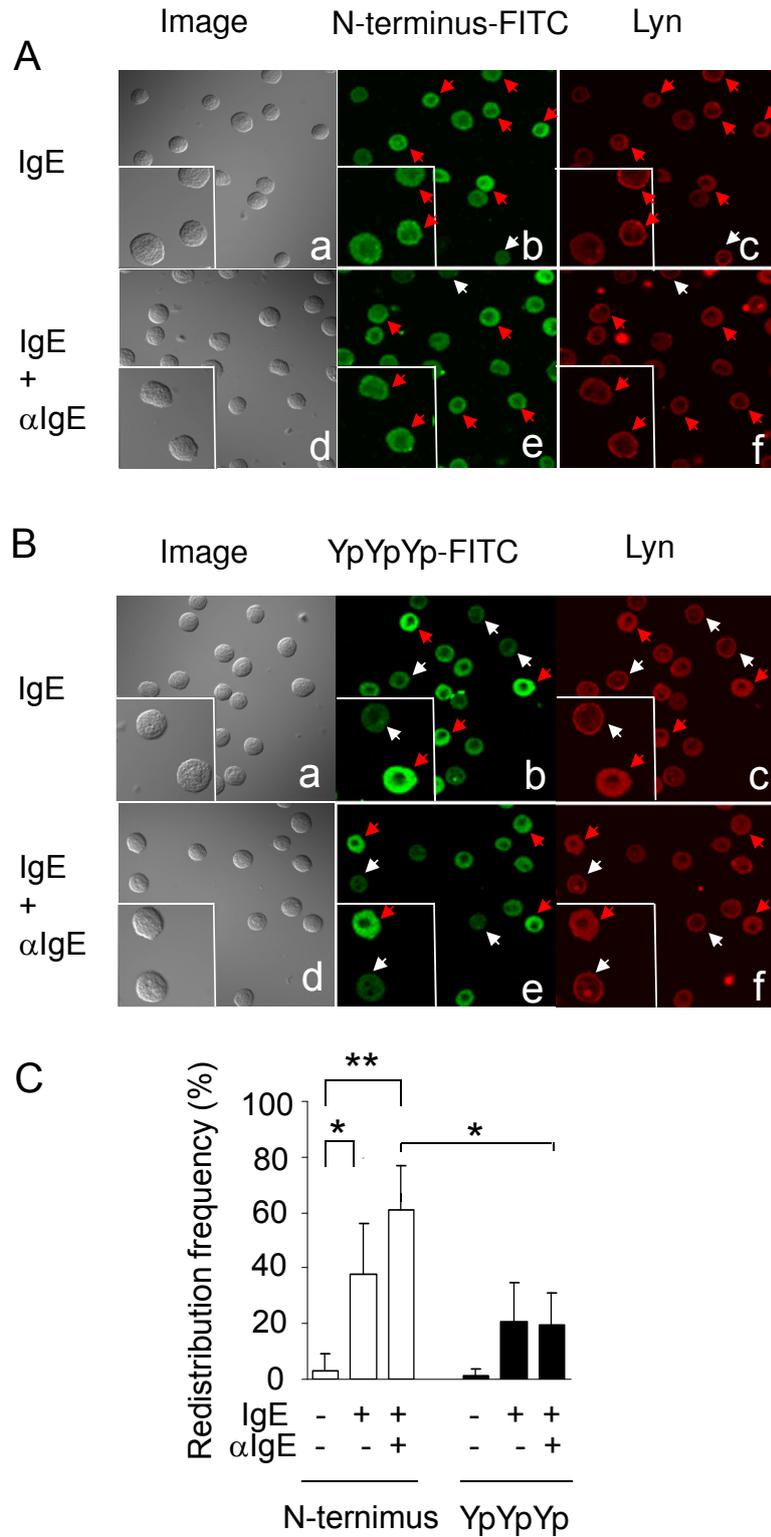


図6. マスト細胞活性化によるLynの細胞膜への移行に対するFc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドの影響

A) コントロールペプチド (Fc ϵ RI β 鎖のN末端) とFc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドを導入したマスト細胞をIgEで感作あるいはIgE + 抗IgE抗体刺激後のFc ϵ RI β 鎖とLynの細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。赤矢印の細胞はペプチドが導入されている細胞で白矢印の細胞は導入されていない細胞。

B) Lynがring状に細胞膜内へ移行した細胞を陽性細胞としてカウントした。(文献12より引用)

の活性化を *ex vivo* で抑制した。β鎖の発現が抑制されたマスト細胞ではLynの細胞膜への移行が阻止されていることがわかった。Lynの細胞膜への移行を阻止するため、FcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドをマスト細胞へ導入するとIgE依存性の活性化が抑制された。FcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドは細胞内Lynに会合し、Lynが細胞膜へ移行するのを抑制していることが共焦点顕微鏡を用いた検討にて確認した。したがって、ヒトのマスト細胞では、FcεRI β鎖とLynの会合を阻止することによってヒトマスト細胞のIgE依存性の活性化を抑制できることがわかった。自然免疫に重要な細胞である単球のセルラインであるU937細胞を用いて検討したが、この細胞でのIL-8産生はペプチドで抑制されなかった。他のLynを発現する細胞で大きな影響がなければ、このペプチドはヒトのアレルギー疾患の新規治療薬として、局所投与などの方法によって安全かつ有効であることが示唆された。

5. 結語

FcεRI β鎖とLynの会合を阻止することによってヒトマスト細胞のIgE依存性の活性化を抑制できることがわかり、β鎖ITAMのチロシン残基を3つリン酸化したペプチドがアレルギー疾患の治療に有用であることが示唆された。

謝辞

本研究の成果は、平成22～23年度日本大学学術研究助成金〔総合研究〕の支援によりなされたものであり、ここに深甚なる謝意を表します。

文献

- 1) Furumoto Y, Nunomura S, Terada T, et al.: The FcεRI β immunoreceptor tyrosine-based activation motif exerts inhibitory control on MAPK and IκB kinase phosphorylation and mast cell cytokine production. *J Biol Chem* 2004; **279**: 49177-49187.
- 2) Lin S, Cicala C, Scharenberg AM, et al.: The FcεRI β subunit functions as an amplifier of FcεRI γ-mediated cell activation signals. *Cell* 1996; **85**: 985-995.
- 3) Dombrowicz D, Lin S, Flamand V, et al.: Allergy-associated FcR β is a molecular amplifier of IgE- and IgG-mediated in vivo responses. *Immunity* 1998; **8**: 517-529.
- 4) Donnadieu E, Jouvin MH, Kinet JP: A second amplifier function for the allergy-associated FcεRI-β subunit. *Immunity* 2000; **12**: 515-523.
- 5) Matsuda A, Okayama Y, Ebihara N, et al.: High-affinity IgE receptor-β chain expression in human mast cells. *J Immunol Methods* 2008; **336**: 229-234.
- 6) Matsuda A, Okayama Y, Ebihara N, et al.: Hyperexpression of the high-affinity IgE receptor-β chain in chronic allergic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**: 2871-2877.
- 7) Saito H, Kato A, Matsumoto K, et al.: Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc* 2006; **1**: 2178-2183.
- 8) Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, et al.: Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**: 1137-1145.
- 9) Okumura S, Kashiwakura J, Tomita H, et al.: Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcεRI. *Blood* 2003; **102**: 2547-2554.
- 10) Jo D, Liu D, Yao S, et al.: Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat Med* 2005; **11**: 892-898.
- 11) Okayama Y, Tkaczyk C, Metcalfe DD, et al.: Comparison of FcεRI- and FcγRI-mediated degranulation and TNF-α synthesis in human mast cells: selective utilization of phosphatidylinositol-3-kinase for FcγRI-induced degranulation. *Eur J Immunol* 2003; **33**: 1450-1459.
- 12) Okayama Y, Kashiwakura JI, Matsuda A, et al.: The interaction between Lyn and FcεRI β is indispensable for FcεRI-mediated human mast cell activation. *Allergy* 2012; **67**: 1241-1249.